

РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА  
МИНИСТЕРСТВО ЗА  
ОБРАЗОВАНИЕ И НАУКА

ГОДИШЕН ИЗВЕШТАЈ  
ЗА НАУЧНОИСТРАЖУВАЧКИ ПРОЕКТ  
Образец ОБ-2

ШИФРА НА ПРОЕКТОТ: ЗФ-КЗР-001

НАСЛОВ НА ПРОЕКТОТ: Дијагностицирање, контрола и заштита од фитоплазмите -  
причинители на болести кај виновата лоза и околната вегетација

ГЛАВЕН ИСТРАЖУВАЧ: Проф д-р Саша Митрев

ИНСТИТУЦИЈА: Универзитет „Гоце Делчев“ Штип, Земјоделски факултет

ТРАЕЊЕ НА ПРОЕКТОТ: 2 год.

од: 01.10.2010  
до: 30.09.2012

БРОЈ НА ДОГОВОР: 15-1180/1

од 15.04.2011

ИЗВЕШТАЈНА ГОДИНА: 2012

ДАТУМ НА ПОДНЕСУВАЊЕ НА ИЗВЕШТАЈОТ: XI. 2012

---

Овој извештај се пополнува во 3 копии и се доставува до Министерството за  
образование и наука

## **1. УЧЕСНИЦИ ВО РЕАЛИЗАЦИЈАТА НА ПРОЕКТОТ ВО ИЗВЕШТАЈНАТА ГОДИНА**

(Име и презиме, научно/наставно-научно звање, матична институција)

а) Главен истражувач:

Проф д-р Саша Митрев – редовен професор на Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ Штип

б) Соработници – истражувачи:

1. Проф д-р Илија Каров - редовен професор на Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ Штип

2. Проф д-р Душан Спасов - вонреден професор на Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ Штип

в) Соработници – млади истражувачи

1. м-р Емилија Костадиновска - асистент на Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ Штип

2. м-р Билјана Атанасова - асистент на Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ Штип

## **2. ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО СОДРЖАНИ ВО ПРЕДЛОГ-ПРОЕКТОТ И НИВНО ВРЕМЕНСКО ТЕРМИНИРАЊЕ:**

Денес, поради зголемувањето на бројот и степенот на заболувања кај виновата лоза, потребна е постојана контрола на патогените кои ја напаѓаат лозата. Според испитувањата на виновата лоза во светот, се смета дека таа е домаќин на повеќе од 32 фитопатогени габи, повеќе од 55 вируси и 3 бактериски заболувања.

Болестите, за кои денес со сигурност се знае дека се предизвикани од фитоплазми (потврда со употреба на современи молекуларни методи), многу долго се сметале за вирусни (околу седумдесет години после откривањето на вирусите) (Saglio and Whitcomb, 1979)).

Фитоплазмите предизвикуваат многу деструктивни заболувања кај виновата лоза и претставуваат проблем во современото лозарство, посебно во големите значајни виноградарски земји (Франција, Италија, Шпанија) (Boudon Radieu, 2000).

Знаејќи ја симптоматологијата на болените растенија како и степенот на загуби во приносот во светот, а притоа земајќи ја во предвид минималноста во контролата и испитувањата во Македонија, беа главен предуслов за да се размислува кон сериозно следење на промените кај виновата лоза како и лабораториски тестирања со цел да се докажат причинителите на тие промени.

Имајќи ја во предвид симптоматологијата и биологијата на патогените, многу е тешка идентификацијата доколку се проучуваат само симптомите кај виновата лоза.

За ова детално испитување на карактеристиките на фитоплазмозите беа предвидени следниве цели:

1. Испитување на присуството и видот на фитоплазмите кај различни сорти на винова лоза на целата територија на Република Македонија, каде се одгледува оваа култура;
2. Испитување на присуството и видот на фитоплазмите присутни кај плевелната вегетација присутна во лозарските региони;
3. Проучување на начинот на пренесување на фитоплазмозите (од плевелната вегетација на виновата лоза);
4. Испитување на осетливоста на различни сорти винова лоза, спрема фитоплазмите;
5. Контрола на увозот на посадочен материјал кои влегува на територијата на Република Македонија, за можно присуство на фитоплазмози;
6. Одредување на присуството и распространетоста на векторите на фитоплазмите *Scaphoideus titanus*, *Hylestes obsoletus*, со посебен акцент на присуството или отсуството на *Scaphoideus titanus* (единствениот вектор на *Flavescence dorée* (FD) - карантинската фитоплазма во светот);
7. Следење на циклусот на инсектите-вектори и молекуларни анализи со цел да се докаже начинот на пренесување на фитоплазмите во Македонија;
8. Лабораториска дијагностика на колекционираниот материјал, со цел со помош на најсовремени молекуларни анализи да се утврди точниот вид на фитоплазмоза за да може да се превземаат заштитни мерки;
9. Примена на навремени и соодветни мерки за заштита на виновата лоза;
10. Информирање на одгледувачите на лозови насади за симптоматологијата и примена на соодветни мерки за заштита при појавата на фитоплазмозите.

Од предвидените цели на истражувањето направена е идентификација на видовите на фитоплазми кои се присутни кај виновата лоза на територијата на Република Македонија, преку употреба на најсовремена техника на идентификација - полимеразна веризна реакција (PCR – Polymerase chain reaction).

Исто така, направено е континуирано следење на ситуацијата на терен, следење на појава на симптомите во зависност од климатските услови како и следење на можноста за биолошко опоравување на маркираните симптоматични лози.

### 3. ОЧЕКУВАНИ РЕЗУЛТАТИ ОД ИСТРАЖУВАЊЕТО СОДРЖАНИ ВО ПРЕДЛОГ-ПРОЕКТОТ И НИВНО ВРЕМЕНСКО ТЕРМИНИРАЊЕ

Отпорноста на болести е едно од главните својства во програмата за одгледување на растенијата како резултат на сериозните економски загуби што тие ги причинуваат кај повеќето култури.

Имајќи ја во предвид слабата проученост на фитоплазмите на територијата на Македонија, и се поголемата важност на виновата лоза во производствениот дел, ова истражување го спроведуваме со цел да ја разјасниме појавата и присуството на фитоплазмите во Македонија, контрола на посадочниот материјал кој влегува на нашата територија како и испитување на младите насади.

Во истражувањето ќе бидат вклучени поголемите површини под винова лоза на територијата на Македонија како и граничните површини со нашиот сосед Србија, каде со сигурност е потврдено присуството на *Flavescence dorée* (FD), (Дудук и сор., 2003).

Исто така, во текот на нашето двегодишно истражување ќе вршиме контрола на увозот на садниот материјал, без разлика дали садниот материјал доаѓа од Србија, Италија, Грција, мора да се спроведуваат внимателни мерки за контрола со цел да се спречи увозот на болести.

Ова истражување ќе биде од особено значење за земјоделците кои подигнуваат нови лозови насади и за оние кои веќе долги години се занимаваат со одгледување на виновата лоза, но поради недоволните податоци и истражувања за оваа група на патогени причинители на болести, немале можност за спречување на угинување на лозанките па и на во некои случаи на цели парцели (зависност од видот и осетливоста на сортата).

### 4. ОСВРТ НА РЕАЛИЗАЦИЈАТА НА ИСТРАЖУВАЊЕТО ВО ПОГЛЕД НА ПОСТИГНУВАЊЕТО НА ТЕРМИНИРАНИТЕ И ДЕФИНИРАНИТЕ ЦЕЛИ И ОЧЕКУВАНИТЕ РЕЗУЛТАТИ СОДРЖАНИ ВО ПРЕДЛОГ-ПРОЕКТОТ:

Во Македонија првите симптоми на жолтеене кај виновата лоза биле забележани во 1975 година во Неготинско, Кумановско, Струшко, Дебарска Жупа и во околината на Богданци. Поголем број на симптоматични растенија од винова лоза биле забележани на две парцели од сортата Шардоне, која е позната во светот како многу осетлива сорта на фитоплазматични болести (Пејчиновски, Ф, необјавени податоци).

Оттогаш е започнато со следење на симптоматологијата на патогените предизвикувачи на болести кај виновата лоза и во 2001 год е објавен преглед на патогените промени кај виновата лоза во регионот (Митрев С., и сор. 2001).

Имајќи ја во предвид симптоматологијата и биологијата на патогените, мошне е тешка идентификацијата доколку се проучуваат само симптомите кај виновата лоза.

Затоа во 2003 год за прв пат е извршена молекуларна идентификација кај симптоматични сорти на винова лоза од Велес и Скопје. Притоа потврдено е присуството на *Bois noir* (BN) фитопlasма (Šeruga et al., 2003).

Понатамошните наши истражувања беа проширени на повеќе региони под винова лоза на територијата на Република Македонија и беше утврдено присуството, распространетоста и видот на фитоплазмите (Митрев, С., и сор. 2007).

Сепак, сите досегашни анализи беа насочени кон проучување на присуството/отсуството на фитоплазмозите кај виновата лоза, но не беше земен во предвид начинот на инфекција на виновата лоза (преку посадочен материјал, од плевелната вегетација преку инсекти-вектори).

Ова истражување својот акцент го стави покрај на дијагностицирање на присуството на фитоплазмозите кај виновата лоза, туку и на проучување на начинот на пренесување на фитоплазмозите – циклус на појава и ширење на фитоплазмозите, и претставува чекор напред во превземањето на соодветни мерки за заштита.

## **5. ДЕТАЛЕН ИЗВЕШТАЈ ЗА НАУЧНО-ИСТРАЖУВАЧКИОТ ПРОЕКТ ЗА ИЗВЕШТАЈНАТА ГОДИНА:**

### **Значење на виновата лоза и лозарството во Република Македонија**

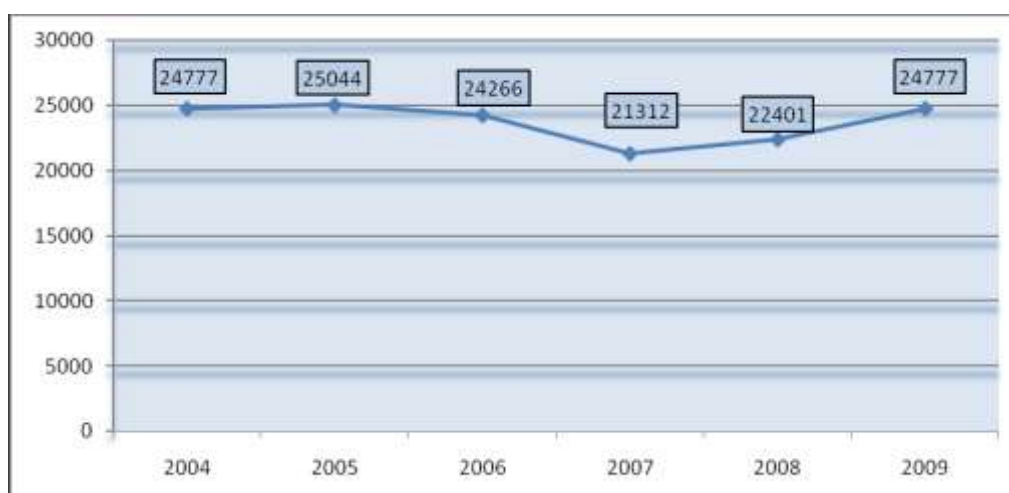
Денешната структура на земјоделските фарми во Република Македонија е создавана во периодот до 1990 година, при што се карактеризира со повеќе мали приватни фарми (индивидуален сектор) кои опфаќаат 80% од целокупното земјоделско земјиште и ограничен број поголеми земјоделски фирми кои обработуваат 20% од земјиштето. Покрај ова, во минатото површината на обработлива земја која може да ја поседува приватното лице беше ограничена. Ова ограничување, заедно со постапката на наследување на земјата резултираше со висок степен на фрагментирање на приватните фарми.

Ваквата состојба од минатото има влијание во лозарството и производството на вино. Во пазарот се вклучени околу 25.000 фарми од областа на лозарството, од кои 70% се индивидуални стопанства и 30% се земјоделски фирми. Просечната површина на парцелите е помеѓу 1.1 ха и 1.3 ха фрагментирана во неколку парцели со површина од 0,3-0,4 ха.

Вкупната површина под лозови насади во Република Македонија во периодот од 2004 до 2007 година е намалена за околу 14% (од 24.777 ха во 2004 на 21.312 ха во 2007 година).

Спротивно на овој негативен тренд на опаѓање на површините под лозови насади (2004-2007), во 2008 година е забележан пораст од 1.089 ха во однос на 2007 година. Ова зголемување на лозов насад продолжува и во 2009 година со 2.376 ха во однос на 2008 година што се должи на воведувањето на мерката за финансиската поддршка за подигање на нови лозови насади, а со цел подобрување на старосната и сортната структура на лозовите насади. Во последните шест години (2004-2009) површината под лозови насади во просек изнесува 23.762 ха.

Графикон 1 - Вкупна површина под лозови насади во РМ во период 2004-2009 (во ха)



Извор: Државен завод за статистика

#### Географска застапеност на лозовите насади

Во Република Македонија постои еден лозарски реон кој се совпаѓа со целата територија на Република Македонија. Името на географската област на реонот е Македонија.

Основното производство е лоцирано по течението на реката Вардар со следниве виногорја: Скопско, Велешко, Тиквешко и Гевгелиско-Валандовско виногорје кое опфаќа околу 83% од вкупното производство на грозје и вино. Останати виногорја во кои се врши производство на грозје и вино со околу 17% се следниве: Струмичко-Радовишко, Овчеполско, Кочанско-Виничко, Кумановско, Кратовско, Прилепско, Битолско и Охридско виногорје.

Во реонот Македонија има 16 под-региони (виногорја) кои се карактеризираат со различни производствени услови и различен интензитет на производство. Имено, тиквешкото виногорје е област на која отпаѓа најголемиот дел од производството на грозје и вино во РМ (околу 30%). По него, следат гевгелиско-валандовското виногорје, струмичко-радовишкото виногорје, скопското виногорје, велешкото виногорје.

#### Структура на лозовите насади

Ефикасното искористување на земјоделско земјиште во Република Македонија е попречено од неговото фрагментирањето во парцели, како резултат на претходните ограничувања на површини кои може да се користат и поседуваат, обичаите за наследство, како и традицијата за релациите на промет на земјиште (купопродажба).

Слабиот промет на земјиште, кој не придонесе на консолидирањето/окрупнувањето на фармите, како и слабиот економски пораст и недостаток на социјална безбедност, и понатаму го потхранува процесот на фрагментација и диверзификација на производството во мали парцели, со цел да се спречат пазарните флуктуации и да се задоволат потребите од храна.

Како резултат на ваквите состојби и долгиот временски период на мали инвестиции, лозовите насади во Република Македонија се со неповолна старосна структура.

Околу 60% од лозовите насади се постари од 15 години, а 38% од вкупната површина под лозови насади е на крајот на својот продуктивен живот. Истите треба приоритетно да бидат цел на инвестиција за нивно обновување (копачење/пресадување) со цел да се одржи производствениот (квантитативен и квалитативен) потенцијал.

Асортиманот на сортите на винско грозје е несоодветен во однос на неговиот квалитет, локацијата на производство и промовирање на пазар. Сегашната застапеност на сортите на винско грозје често не е во согласност со правните акти за класификација на сортите на грозје кои во моментот се на сила. Покрај тоа, висок процент на лозови насади се лоцирани во т.н зони подложни на мразеви каде замрзнување на окцата е честа појава. Заменувањето на несоодветните сорти на грозје и на лозови насади од зоните подложни на мразеви на подобри локации ќе придонесе кон подобрување на квалитетот и постабилни приноси.

Употребата на процесите базирани на механизација во производството на лозови насади е незначителна (моментално се користи механизација само за обработка на почвата и за заштита на виновата лоза). За ампело-технички мерки, берба и сл. не се користи механизација. Постојните трактори и помошната опрема се технички и економски застарени, со чести расипувања и висока потрошувачка на гориво и масло. Оттука, потребно е обновување на механизацијата и специјализираната опрема која се користи при одгледување на винова лоза за да се намалат производствените трошоци, да се поефтини производството, да се подобри квалитетот и навреме да се обавуваат сите потребни мерки и операции во лозарството.

Долгорочно, постоењето на мали и фрагментирани парцели на лозови насади, дури и со производство со среден интензитет, не овозможува поинтензивна модернизација и механизација при што доведува до резултат да бидеме помалку конкурентни на пазарот. Во последниве неколку години, неколку компании кои дејствуваат во други економски сектори различни од земјоделството започнаа да инвестираат во лозовите насади и производството на вино. Како резултат на овие инвестиции, лозовите насади се значително обновени во некои од познатите области, посебно на погодните почви во Тиквешкото и Гевгелиско-валандовското виногорје. Во овие области е зголемено и производството на грозје и во индивидуалниот сектор.

## Б. Болести кај виновата лоза

Виновата лоза, како и секоја останата земјоделска култура, се соочува со проблеми во текот на одгледувањето поради појавата на голем број на болести, штетници и плевели, кои нанесуваат сериозни загуби во приносот. Како резултат на истражувањата кои се правени со години наназад, природата на повеќето болести е добро проучена и постојат мерки за заштита од нив, меѓутоа кај извесни патогени промени, сузбивањето е тешко или пак природата на промените е од непознато потекло. Денес се смета дека виновата лоза е домаќин на повеќе од 32 патогени габи, повеќе од 55 вируси и 3 бактерии (Pearson & Goheen, 1988; Martelli 2003).

Како најчести и доста слабо проучени промени кои се јавуваат на виновата лоза се „жолтилата“, односно „црвенилата“, за кои се одговорни фитоплазмите.

Потеклото на оваа група на бактериски промени кај виновата лоза, долго време се сметало за вирусно, се до седумдесетите години од откривањето на вирусите (Saglio & Whitcomb, 1979).

Фитоплазмите за прв пат се откриени со помош на електронска микроскопија во 1967 година. Тоа се прокариотски микроорганизми, плеоморфни, без клеточен

сид, опкружени со трослојна мембрана, со големина од 200-800 nm. Фитоплазмите се група на облигатни паразити кои живеат во флоемските садови на растенијата. Фитоплазмите заедно со вирусите кој се пренесуваат на перзистентен начин, спаѓаат во ретка група на микроорганизми кои се способни да паразитираат во растителните и животинските микроорганизми.

Најчесто предизвикуваат жолтила, заостанување во растот, абнормална пролиферација на делови од растението, како што се листовите, стеблата, гранките, деловите од цветот (phyllody), за на крај да доведат до постепено пропаѓање на растенијата. Фитоплазмите се регистрирани како нестроги специфични патогени, затоа што често може да се сретнат и кај други растителни видови и фамилии.

Фитоплазмите предизвикуваат многу деструктивни заболувања кај виновата лоза и претставуваат проблем во современото одгледување на виновата лоза во поголемите значајни винарски центри (Франција, Италија, Шпанија), (Boudon-Padieu, 2000, Boudon-Padieu, 2003).

Појавата на жолтила кај виновата лоза можат да бидат предизвикани од фитоплазми од 7 различни рибозомални групи. До денес на виновата лоза се утврдени фитоплазми од следниве рибозомални групи: 16SrI, 16SrII, 16SrIII, 16SrV, 16SrVII, 16SrX и 16SrXII (Gibb et al., 1999; Varga et al., 2000; Boudon-Padieu, 2003).

Фитоплазмите се идентификувани со помош на полимеразна верижна реакција (PCR-polymerase chain reaction), со амплификација со фитоплазматски генетски прајмери за 16S rRNA гени и прајмери специфични за фитоплазматската група (Lee et al. 2000).

Освен споменатата фитоплазматска секвенца (серија), се користат и други како што е генот за издолжување – фактор – Tu (*tuf*), други рибозомални гени, 23S rDNA и 16/23S rDNA интергенски регион познат како рибозомална DNA секвенција (низа) - (non ribosomal DNA sequences), која се користи како самостоја или во комбинација со 16S rDNA за утврдување на фитоплазматската разлика, (Gundersen et al. 1997; Smart et al. 1996; Vibio et al. 1996; Boudon-Padieu et al. 1997; Daire et al. 1997a; Schneider et al. 1997; Lee et al. 1998; Marcone et al. 2000).

Основна карактеристика на фитоплазмите кај виновата лоза е брзото раширување и големата економска штета, кои често доведуваат до сушење на лозите и пропаѓање на насадот.

Во природни услови фитоплазмите се пренесуваат со помош на инсекти – цикади од редот Homoptera (Osler et al., 1996, Agrios, 1997, Jones, 2002). Пренесувањето на фитоплазмите се врши и преку калемење на видовите.

Во нашата земја, до денес, фитоплазмите се многу малку или воопшто не се истражени. Според забелешки на проф. д-р Филип Пејчиновски (усмена комуникација), првите симптоми на златно жолтење ги има забележано во 1974 година, кај сортата бело зимско. Подоцна, истите симптоми биле забележани кај сортата жилавка во околината на Неготино, Кумановско, Струшко и Дебарска жупа. Овие констатации за присуството на жолтила кај виновата лоза, биле направени како резултат на теренската анализа на симптомите кај лозата. Лабораториски потврдувања не биле направени. Во 2001 година, биле извршени првите подетални молекуларни анализи за потврдување на присуството на фитоплазмите на територијата на Република Македонија, (Шеруга и сор., 2003).

Притоа, потврдено е присуството на *Bois noir* (BN) (столбур фитоплазма), со PCR-RFLP анализи на рибозомалните и нерибозомалните гени кај симптоматичните сорти на винова лоза (Шеруга и сор., 2003).

Тогаш биле земени само две територии како цели на испитување, но во текот на ова истражување се земени повеќе ареали под винова лоза со цел да се одреди географската дистрибуција на BN фитоплазмите кај виновата лоза во Македонија.



Оваа фитоплазма спаѓа во столбур групата и е широко распространета во Европа и Медитеранските земји, и освен виновата лоза како домаќин, оваа фитоплазма може да се сретне и кај голем број на диви и култивирани растенија (Marcone et al. 1997, Schnaider et al. 1997a).

Вектор на пренесување на оваа фитоплазма е цикадата *Hyalestes obsoletus*, Signoret 1867 (Maixner et al, 1995).

## Материјал и методи на работа

За успешно спроведување на мониторинг за присуство на фитоплазми кај виновата лоза, како и за примена на соодветни мерки за заштита методите на работа беа поделени во две групи:

### 1. Теренски истражувања:

- преглед на маркираните лозови насади (оние кои беа следени во сезона 2011);
- следење на текот на болеста, развој и ширење, како и биолошка отпорност (повлекување на симптомите и излекување) на заболените ластари од винова лоза;
- маркирање на присуството на фитоплазмите кај виновата лоза во различни региони во Република Македонија;
- одредување на степенот на штетноста на фитоплазмозите кај виновата лоза;
- проучување на етиологијата на болеста и идентификација на патогенот.

### 2. Лабораториски истражувања:

- Молекуларни методи за докажување на присуството на фитоплазмите:

- а.) екстракција на дезоксирибо нуклеинската киселина (ДНК) од фитоплазмите;
- б.) полимеразно верижна реакција (PCR – Polymerase Chain Reaction) – директен и вгнезден (Nested PCR);
- в.) полиморфизам по должина на рестрикциските фрагменти (RFLP - restriction fragment length polymorphism) за типизација на видот на фитоплазмата.

### 1. Теренски истражувања

Преглед на лозовите насади и собирање на примероци од растенија со симптоми на „жолтила“ т.е. „црвенила“ по листовите

Преглед на лозовите насади во поголемите региони под винова лоза на територијата на Република Македонија, за дијагностицирање, контрола и заштита од фитоплазматските заболувања, беше извршен во текот на летото 2010 година.

Лозови региони кои беа предмет на нашето истражување се наоѓаа во близина на: Штип, Свети Николе, Велес, Куманово, Радовиш, Струмица, Неготино, Кавадарци, Гевгелија, Валандово.

Собраните примероци покажуваа симптоми како оние карактеристични за жолтилата кај виновата лоза како што се: пожолтувања на листовите со совивање на лисните краеве према внатре и добивање на карактеристичен триаглест изглед, неправилно задрвенување на гранчињата, сушење и изумирање.

Во лозовите насади каде визуелно неможеа да се согледаат карактеристични симптоми, беа колекционирани асимптоматични примероци кои беа посебно маркирани на терен и забележувани во табелата за евиденција во лабораториски услови. Освен примероците од виновата лоза, на некои локалитети каде што имаше присуство и на околната вегетација, беа колекционирани голем број на плевелни растенија за кои од литература претходно се знаеше дека можат да бидат примарни домаќини на фитоплазмите.

Шифрарник користен во базата на податоци за виновата лоза

Генерални податоци за лозовите региони – теренски податоци

Број	Локација	Назив на лозовиот регион	Сорта	Симптоми	Вид на колекциониран иот материјал (единечна лоза или збир од повеќе симптом. лози)	Дата на колекционирање	Дата на екстракција

Лабораториска анализа на материјалот

Датум на екстракција на DNA

PCR анализа – P1P7 – M1B6

PCR анализа – P1P7 – I F1R1

RFLP анализа – типизација на видот на фитоплазма

## 2. Лабораториски истражувања

### ДНК екстракција и PCR амплификација

За молекуларна детекција на фитоплазмите од колекционираниот материјал прво беше извршена екстракција на дезоксирибонуклеинската киселина (ДНК). Од примероците кои беа собрани беше одмерено 1 g ткиво (главната нерватура) и беше замрзнато (-20°C).

Екстракцијата беше извршена по веќе опишан СТАВ протокол на работа (Angelini et al., 2001).

Добиените чисти ДНК примероци се чуваат на температура од - 20°C.

За 16SrDNA амплификацијата направен е директен PCR, проследен со вгнезден - нестед (втор, следен) PCR (се применува заради зголемување на специфичноста и сензитивноста на амплификацијата), со употреба на универзална и специфична група на прајмери.

Универзална група на прајмери кои беа користени се: R16 P1/P7 (Deng & Hiruki, 1991; Smart et al., 1996) (директен PCR), R16 M1/B6 (nested PCR), специфична група на прајмери I F1R1, како и специфични tuf прајмери ftuf1-rtuf1 (директен PCR) ftufAY-rtufAY (nested PCR) (Langer & Maixner, 2004), специфични за идентификација на BN фитоплазмата.

После добиените резултати од nested PCR, ре-амплифицираниот дел од 16SrDNA се подложува на уште еден нестед PCR со специфична група на прајмери I F1R1. Секоја реакција се изведува во тотален волумен од 20 µl со содржина од дестилирана вода, 10x PCR пуфер, MgCl<sub>2</sub>, dNTP сет, парови на прајмери, taq полимераза и ДНА од примерокот.

Сите PCR анализи се одвиваат во 35 циклуси, вклучувајќи три чекора: денатурација на 94°C (раскинување на водородните врски меѓу комплементарните вериги), анилирање (хибридизација на олигонуклеотидните прајмери со комплементарните секвенци на двете раздвоени матични ДНА вериги) на 50°C и полимеризација (екстензија, синтеза) на 3' крајот на секој од анилираните олигонуклеотидни прајмери со термостабилна ДНА taq полимераза при 72°C.

Чекори	Иницијална денатурација	34 циклуса на реамплификација			Терминална екстензија
		денатурација	анилирање	екстензија	
време/ температура	3 минути - 94°C	1 минута -94°C	2 минути - 50°C	3 минути – 72°C	5 минути – 72°C

PCR-реакцијата овозможува детекција на извонредно мало количество на ДНА. Ова е брз амплификациски метод кој се изведува во *in vitro* услови и се врши во специјални апарати означени како PCR-машини (термосајклери).

После PCR анализата, ампликоните се подложни на електрофореза во 1% агарозен гел, на 100V околу 30 мин., отстојуваат во етидиум-бромид и се отчитуваат на УВ-трансилуминатор.

По агарозната електрофореза на амплифицираните PCR продукти и визуелизација на геловите, се добиваат исклучително специфични ДНА ленти (банд-ови).

## Анализа на полиморфизмот по должина на рестрикциските фрагменти (RFLP) на фитоплазматскиот 16S rDNA ген

После завршениот нестед PCR, позитивните примероци се дигестираат со рестрикциски ендонуклеази (класа на ензими кои ги хидролизираат фосфодиестерските врски во двоверижната ДНА), *Taq I*, *Tru 9I* и *Hpa II* за дигестија на амплифицираните фрагменти на *tuf* генот (850 bp), по посебен протокол за секој ензим. Дигестијата се одвива 2 часа на 37°C. Бандовите се раздвојуваат со електрофореза во 13% полиакриламиден гел, со отстојување на гелот во етидиум-бромид и документирање на резултатите на УВ-трансилуминатор.

### Резултати

Во текот на втората година од истражувачкиот период 2010 -2012 год, десет локалитети од седум поголеми региони под винова лоза на територијата на Република Македонија беа предмет на испитување за појавата, присуството и дистрибуцијата на фитоплазмите. Резултатите од опишаните симптоми на примероците собрани од терен беа потврдени со резултатите од лабораториските анализи (Табела 1).

Изведените прегледи потврдија дека на заболените гранчиња од винова лоза се јавува еден низ на патогени промени. Типот и интензитетот на овие промени зависи од фенофазата, сортата и нејзината осетливост према фитоплазматските заболувања како и од староста на лозанката.

#### Промена на листовите

Кај белите сорти на винова лоза, препознатливи симптоми на листовите се жолтеене, совивање на лисните краеве према доле во облик на триаголник и некротирање (прилог фотографии).

Листовите на почеток добиваат посветло-жолта боја за до крајната фаза на болеста да добијат сјајна златно-жолта боја која се прелива под влијание на сончевите зраци (прилог фотографии).

Во доцниот стадиум на болеста доаѓа до некроза и лесна кршливост на листовите.

Кај црните сорти на винова лоза доаѓа до потемно или посветло поцрвенување на листовите, кои како и кај белите сорти, во доцниот стадиум на болеста почнуваат да некротираат (прилог фотографии).

#### Промена на ластарите

Најзначајни промени кои беа потврдени кај заразените ластари од виновата лоза е нивното недоволно задрвенување т.е. нивната еластичност. Таквите ластари се извиени, тежнеат и полегнуваат кон земјата. Поради недоволното одрвенување, таквите заболени ластари постануваат крути и при увивање лесно пукаат (прилог фотографии).

#### Сушење на гроздовите и одумирање на целата лозанка

Симптомите од фитоплазматските заболувања, во подоцната фаза од инфекцијата јасно се видливи и кај плодовите т.е. гроздовите кај виновата лоза. На почетокот на инфекцијата, кога се оформени гроздовите, зрната се доста осетливи и кај нив не настанува созревање, туку тие почнуваат да се собираат, постануваат гумести, се сушат и добиваат горчилав и кисел вкус. На крај, доаѓа до нивно целосно исушување (прилог фотографии).

#### Варирање на фитоплазматските симптоми кај виновата лоза

Интензитетот на гореописаните симптоми следен во текот на двегодишното истражување на присуството на фитоплазмите, варираше во значителни граници. Овие варирања, пред сè зависеа од осетливоста на сортата. Според тоа, кај една иста сорта може да се забележи најразлична дисколорација на листовите, најразлично изостанување на задрвенувањето на ластарите, како и некроза, односно угинување на оболените чокоти.

Теренските анализи покажаа дека како најосетливи сорти на винова лоза се вронец и шардоне.

Во најголем број на случаи, вронецот, црниот бургундец, како и кабеврне совињон, покажуваа најинтензивни симптоми на поцрвенување, во фазата на зрелост т.е. при крајот на вегетациониот период (крајот на август до крај на септември).

Умножување на фитоплазматскиот 16S rDNA ген со полимеразно верижна реакција

После директниот PCR, добиените продукти со големина од 1,8 kbp не беа видливи на агарозна гел електрофореза, па затоа веднаш после првиот – директниот PCR, правев втор или вгнезден PCR, кој се покажа како доста осетлива метода на детекција на фитоплазмите иако се присутни во многу мала концентрација во испитуваното ткиво.

Во вгнездениот PCR, ги користев следните групи на прајмери: M1B6, IF1R1 и група на прајмери специфични за *tuf* генот Ftuf-Rtuf AY. Позитивните примероци кој ги добив универзалната група на прајмери за сите типови на фитоплазми, дадоа електрофоретски линии на агарозниот гел со должина од 1,2 kbp.

Во текот на истражувањето, континуирано беше собираан материјал од почеток на вегетацијата до крајната фаза на вегетацијата, и сите колекционирани примероци беа подложени на лабораториско тестирање.

Табела 1 Резултати од nested PCR за детекција на фитоплазмите од 16SrXII-A подгрупата кај примероци од различни локалитети под винова лоза во Македонија

Регион	Локалитет	Сорта	Присуство на фитоплазматскиот ген докажан со следните групи на прајмери		
			M1/B6	IF1/R1	Ftuf/Rtuf AY
Неготино	Ило Виларов	Италијански ризлинг	-	-	-
		Смедеревка	+	+	+
		Вранец	+	+	+
		Белан	+	+	+
		'Ркцатели	-	-	-
		Жилавка	+	+	+
	Дуброво	'Ркцатели	-	-	-
		Траминец бел	-	-	-
		Кратошија	-	-	-
		Смедеревка	-	-	-
Кавадарци	П.Е. Љубаш	Мускат италиа	-	-	-
		Афус али	-	-	-
		Смедеревка	-	-	-
		Шардоне	+	+	+
Струмица	Хамзали	Белан	+	+	+
		Вранец	-	-	-
		'Ркцатели	-	-	-
		Смедеревка	-	-	-
Радовиш	Добридол	Пловдина	-	-	-
		Смедеревка	+	+	+
		Рајнски ризлинг	-	-	-
		Вранец	+	+	+
Штип	Каваклија	Рајнски ризлинг	-	-	-
		Бургундец црн	-	-	-
	Ежово	Афус али	-	-	-
		Вранец	+	+	+
	Три чешми	Смедеревка	+	+	+
		Рајнски ризлинг	-	-	-
		Бургундец	+	+	+
	Врсаково	Вранец	+	+	+
Велес	Сопот	Шардоне	+	+	+
		Афус али	-	-	-
	Витанци	Бургундец	-	-	-
		Каберне совиньон	-	-	-
		Вранец	-	-	-
Гевгелија	Авлаки	Вранец	+	+	+

**6. МЕЃУНАРОДНА СОРАБОТКА ОСТВАРЕНА ПРИ РЕАЛИЗАЦИЈАТА НА ПРОЕКТОТ ВО ИЗВЕШТАЈНАТА ГОДИНА:**

- Prof Piero A. Bianco – Università Degli Studi Di Milano, Facoltà Di Agraria

**7. ОБЈАВЕНИ РЕЗУЛТАТИ КОИ ПРОИЗЛЕГУВААТ ОД ИСТРАЖУВАЊЕТО:**

**a) Оригинални научни трудови објавени во списанија во:**

земјата: \_\_\_\_\_

странство: Mitrev S., Karov I., Kostadinovska Emilija (2011): Grapevine yellows in the Republic of Macedonia: molecular identification of stolbur phytoplasma strains in grapevine and weeds. 2<sup>nd</sup> European Bois Noir Workshop 2011. Petria 112-113.

**b) Монографски публикации во:**

земјата: \_\_\_\_\_

странство: \_\_\_\_\_

**в) Трудови презентирани на научни собири во:**

земјата: \_\_\_\_\_

странство: \_\_\_\_\_

**8. МАГИСТЕРСКИ, ДОКТОРСКИ СТУДИИ, СПЕЦИЈАЛИЗАЦИИ, УСОВРШУВАЊА, СТУДИСКИ ПРЕСТОИ И КОРИСТЕЊЕ НА ЕКСПЕРТИ ВО ТЕКОТ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО ВО ИЗВЕШТАЈНАТА ГОДИНА:**

- Реализација на резултати за првата година од докторските студии на соработникот млад истражувач во проектот м-р Емилија Костадиновска

**9. НАУЧНИ И ТЕХНОЛОШКИ ИНОВАЦИИ И ПАТЕНТИ:**

---

Во прилог на точките 7 и 9 да се достави список



**10. ИСТРАЖУВАЧКА ОПРЕМА НАБАВЕНА ВО ИЗВЕШТАЈНАТА ГОДИНА:**  
(вид, марка, година на производство, намена, цена на чинење)

**11. РЕКАПИТУЛАЦИЈА НА ПОТРОШЕНИТЕ СРЕДСТВА ЗА РЕАЛИЗАЦИЈА НА ПРОЕКТОТ ВО ИЗВЕШТАЈНАТА ГОДИНА:**  
(по намени и извори на средства)

а) Надомест на истражувачи пензионери /

**б) Непосредни материјални трошоци:**

Потрошена енергија, материјали и сировини	90.000,00 ден
Патувања во земјата	75.000,00 ден
Патувања во странство	/
Дневници, теренски додатоци и други надоместоци	50.000,00 ден
Ангажирање на експерти	60.000,00 ден
Производни и непроизводни услуги (информатички, ПТТ и сл.)	40.000,00 ден
Одржување на научноистражувачка опрема	65.000,00 ден
Набавка на научна литература	55.000,00 ден
Други трошоци	45.000,00 ден
<b>ВКУПНО:</b>	<b><u>480.000,00 ден</u></b>

**в) Извори на средства:**

Сопствено учество	105.000,00 ден
Учество на други институции	/
Учество на меѓународни институции	/
Учество на Министерството за образование и наука	375.000,00 ден
<b>ВКУПНО:</b>	<b><u>480.000,00 ден</u></b>

## **12. ПОВАЖНИ ЗАКЛУЧУВАЊА И НАСОКИ ЗА ПОНАТАМОШНИОТ ТЕК НА ИСТРАЖУВАЊАТА КОИ ПРОИЗЛЕГУВААТ ОД ИСТРАЖУВАЧКИТЕ РЕЗУЛТАТИ:**

Лабораториските молекуларни испитувања на фитоплазматските заболувања, претставуваат најсовремени анализи за потврдување на присуството на фитоплазмите како во Македонија, така и во светот. Фитоплазмите на територијата на нашата земја до 2003 год., лабораториски не се испитувани и не им е посветувано доволно внимание за нивното присуство.

На основа на лабораториската работа заснована на примената на најсовремената техника - полимеразна верижна реакција, извршена е точна идентификација и детерминација на присутната група на фитоплазми, ова има големо значење за правилно поставување на дијагноза и примена на хемиските средства за заштита на растенијата.

Научните сознанија добиени од овој проект се од големо значење за заштитата на виновата лоза не само во нашата земја, туку и пошироко. Вакви проучувања се опишани во литературата во голем број на европски земји како и кај нашите соседи, додека во нашето проучување паралелно и детално е потврдено само присуството на столбур фитоплазмата. Статистиките и заклучоците наведуваат дека БН фитоплазмата има широк ареал на распространување особено имајќи го во предвид фактот дека во сите земји околу Македонија (Бугарија, Србија, Албанија и Грција) БН е одамна евидентирана (Давис и сор. 1997; Дудук и сор. 2004; ЕППО Репортинг Сервице, 2006).

Корисниците на истражувачките резултати ќе бидат директно производителите на винова лоза како во поголемите производни центри така и индивидуалните производители кои имаат проблеми со лозовите насади а кои поради неинформираноста за постоењето на фитоплазмите употребуваат несоодветни сретства за третирање на лозата.

Резултатите од ова истражување ќе бидат пренесувани до производителите преку објавување на извадоци од истражувањето во различни часописи, учество на советувања за одгледување на градинарските култури и во контакти со лица кои се заинтересирани за оваа проблематика или нивните парцели се директно загрозени од појавата на фитоплазмите кај виновата лоза.

Економските и комерцијалните ефекти од ова истражување можат да се согледат како резултат на правилната дијагностика на бактериските заболувања кај виновата лоза и примена на адекватни хемиски средства за сузбивање.

Примената на адекватни и ефикасни средства за заштита ќе допринесе за намалувањето на бројот на третирањата и зголемувањето на нивниот ефект а воедно и со навременото откривање на болестите ќе се спречи раширувањето на фитоплазмите.

## **13. ПЛАН, ДИНАМИКА, ОРГАНИЗАЦИЈА НА ИСТРАЖУВАЊЕТО ВО СЛЕДНАТА ГОДИНА:**

- Лабораториска анализа на колекционираниот материјал од сезоната 2011;
- Детерминација на видот на фитоплазмата;
- Одредување на процент на инфекција на испитуваниот лозов насад;
- Следење на процесот на биолошко опоравување на симптоматичните маркирани лози.

**14. УЧЕСНИЦИ ВО РЕАЛИЗАЦИЈАТА НА ПРОЕКТОТ ВО СЛЕДНАТА ИСТРАЖУВАЧКА ГОДИНА:**

**(име и презиме, научно/наставно-научно звање, матична институција)**

**а) Главен истражувач:**

Проф д-р Саша Митрев – редовен професор на Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ Штип

**б) Соработници – истражувачи:**

1. Проф д-р Илија Каров - редовен професор на Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ Штип

2. Проф д-р Душан Спасов - вонреден професор на Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ Штип

**в) Соработници – млади истражувачи**

1. м-р Емилија Костадиновска - асистент на Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ Штип

2. м-р Билјана Атанасова - асистент на Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ Штип

**15. ФИНАНСИСКИ ПЛАН НА ПОТРЕБНИТЕ СРЕДСТВА ЗА СЛЕДНАТА ИСТРАЖУВАЧКА ГОДИНА: (по намена и извори на средства)**

**а) Непосредни материјални трошоци:**

Потрошена енергија, материјали и сировини	50.000,00 ден
Патувања во земјата	45.000,00 ден
Патувања во странство	70.000,00 ден
Дневници, теренски додатоци и други надоместоци	50.000,00 ден
Ангажирање на експерти	/
Производни и непроизводни услуги (информатички, ПТТ и сл.)	30.000,00 ден
Одржување на научноистражувачка опрема	35.000,00 ден
Набавка на научна литература	/
Други трошоци	50.000,00 ден
<b>ВКУПНО:</b>	<b><u>330.000,00 ден</u></b>

**б) Извори на средства:**

Сопствено учество	105.000,00 ден
Учество на други институции	/
Учество на меѓународни институции	/
Учество на Министерството за образование и наука	225.000,00 ден
<b>ВКУПНО:</b>	<b><u>330.000,00 ден</u></b>

**16. ВЕРИФИКАЦИЈА НА ГОДИШНИОТ ИЗВЕШТАЈ:**

-Одлука на научниот/наставно-научниот/стручниот орган за прифаќање на годишниот извештај бр. \_\_\_\_\_ од \_\_\_\_\_ година  
(во прилог да се достави одлуката)

Потпис на главниот истражувач: \_\_\_\_\_

Потпис на одговорното лице на институцијата: \_\_\_\_\_

Датум и печат: \_\_\_\_\_

## Прилог на фотографии



**Слика 1.** Маркирани регионите кои беа предмет на истражување на територијата на Република Македонија

## Симптоми кај различни сорти на винова лоза



**Слика 2.** Промени во морфологијата кај сортата Шардоне, Велес Сопот



**Слика 3.** Сорта Шардоне, јасно видливи незадрвенети симптоматични ластари и пожолтување на листовите





**Слика 4.** Сушење на гроздовите како резултат на многу силна инфекција од фитоплазми кај сортата Шардоне



**Слика 5.** Симптоми на совивање на листовите кај соратата Смедеревка, Штипско, Ежово



**Слика 6.** Многу јака инфекција кај сортата Шардоне, м.в. Струга, меѓу Амзибегово и Пеширово



**Слика 7.** Симптоми кај неколку лози во ред, кај сортата Шардоне, м.в. Струга, меѓу Амзибегово и Пеширово





**Слика 8.** Симптоми кај сортата Вранец, локалитет Авклаки, Гевгелија



**Слика 9.** Симптоми кај сортата Вранец, локалитет Куманово,  
нелигнифицирање  
на ластарот, предвремено опаѓање на листовите и сушење на  
гроздовите



**Слика 10.** „Црвенило“ кај сортата Каберне Совињон, м.в. Струга, меѓу Амзибегово и Пеширово

## Симптоми кај плевелната вегетација



**Слика 11.** *Cuscuta* spp. околу симптоматична едногодишна лоза – Шардоне



**Слика 12.** *Convolvulus arvensis* околу симптоматична лоза – Шардоне



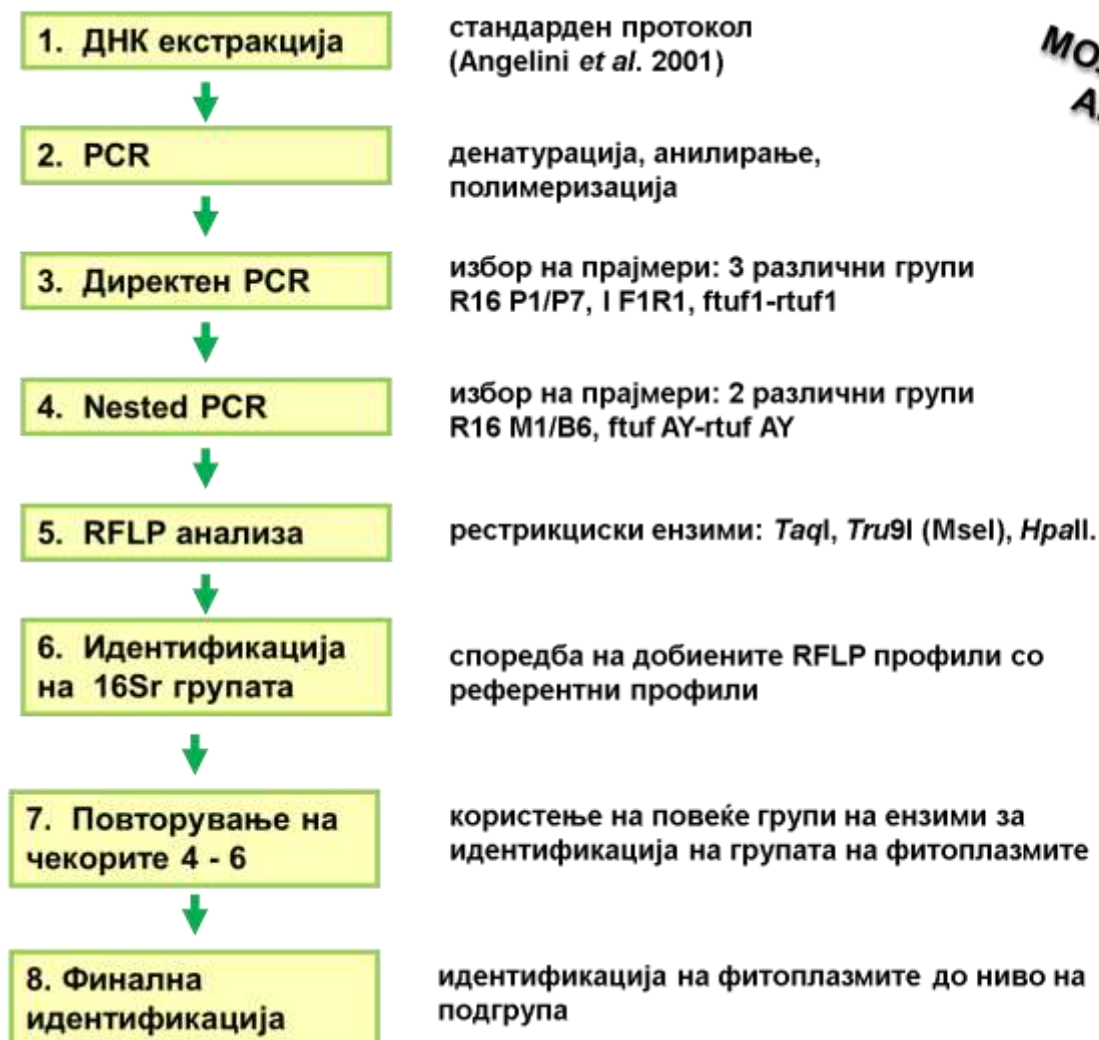


**Слика 13.** *Clematis vitalba* - симптоми на поцрвенување на листовите – фитоплазматски промени



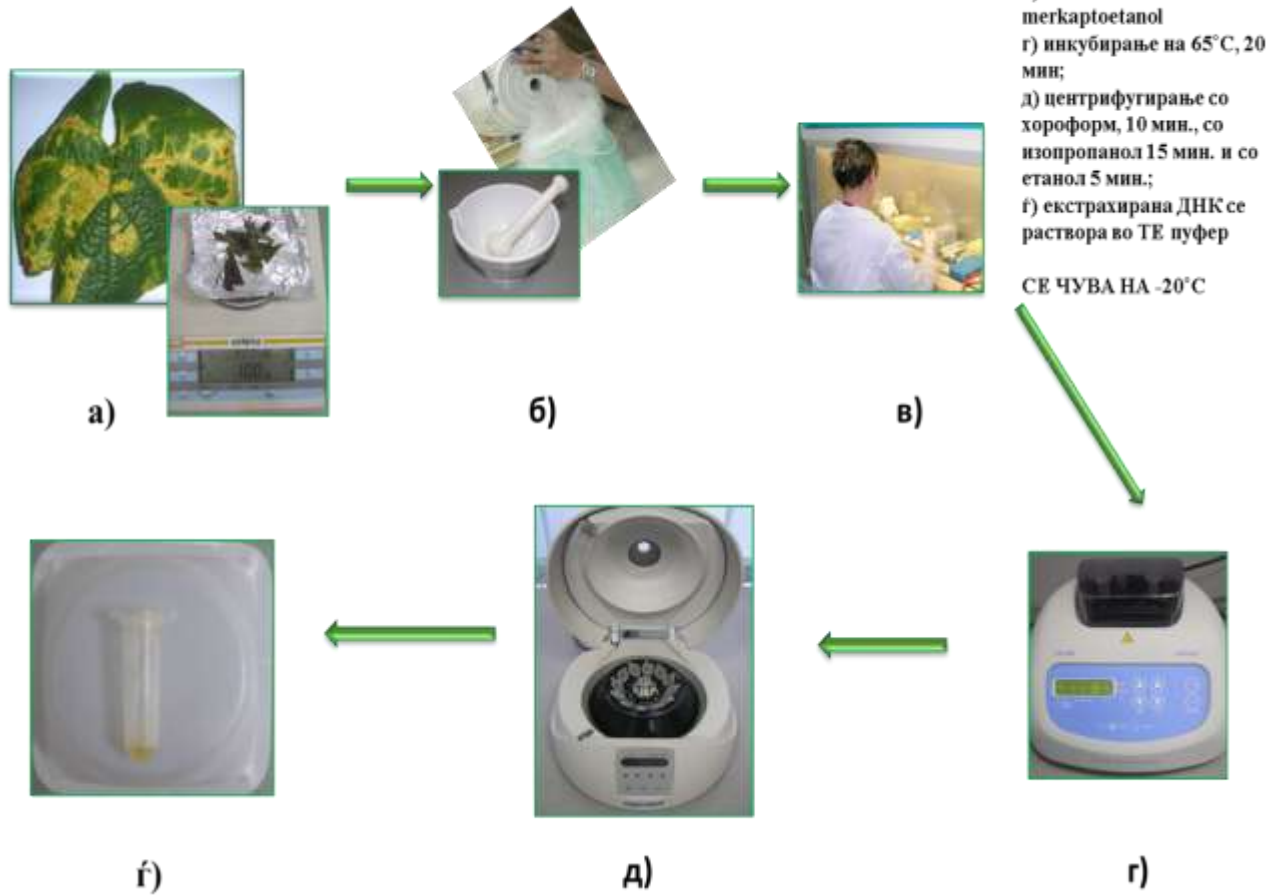
**Слика 14.** *Clematis vitalba* - нетипични симптоми со потврдено присуство на фитоплазматски геном

## ЛАБОРАТОРИСКИ АНАЛИЗИ НА СИМПТОМАТИЧЕН МАТЕРИЈАЛ



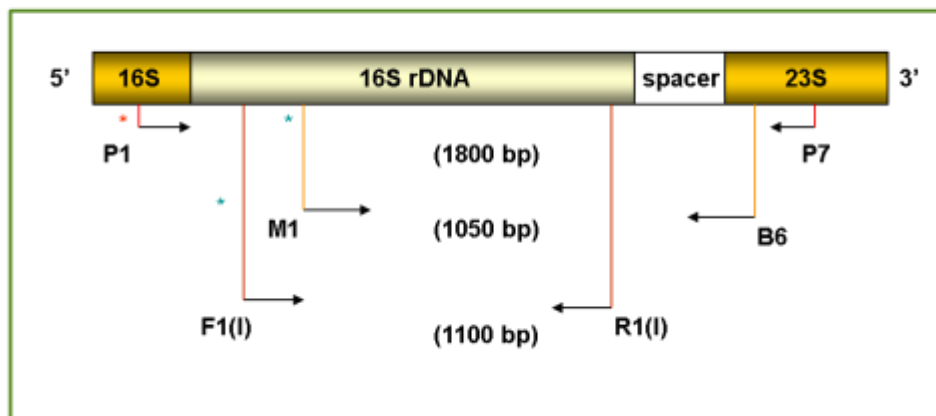
Слика 1. Чекори на лабораториска дијагностика

## Екстракција на рибозомалната ДНК



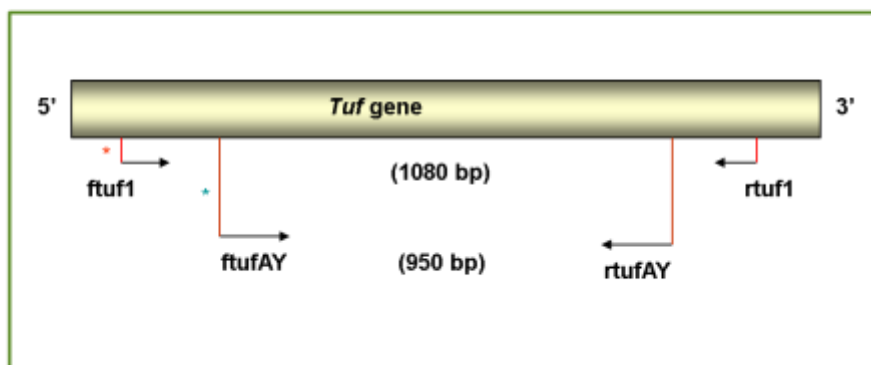
Слика 2. Чекори на екстракција на фитоплазматска ДНК

избор на прајмери: 3 различни групи R16 P1/P7, M1B6, I F1R1



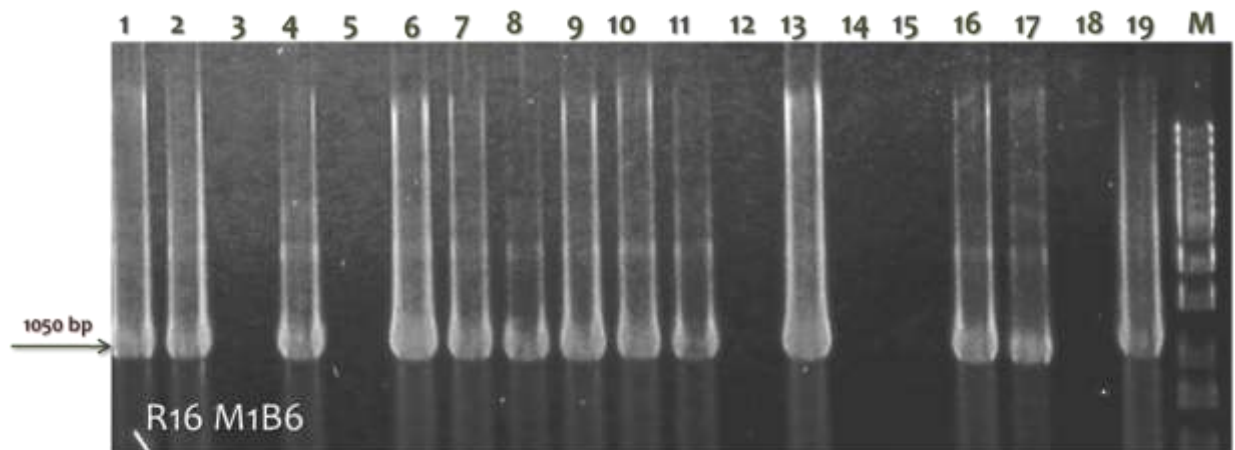
Слика 3. Избор на универзална група на прајмери за детекција на присуство на фитоплазми

прајмери специфични за *tuf* геном: ftuf1-ftuf1, ftufAY-rtufAY

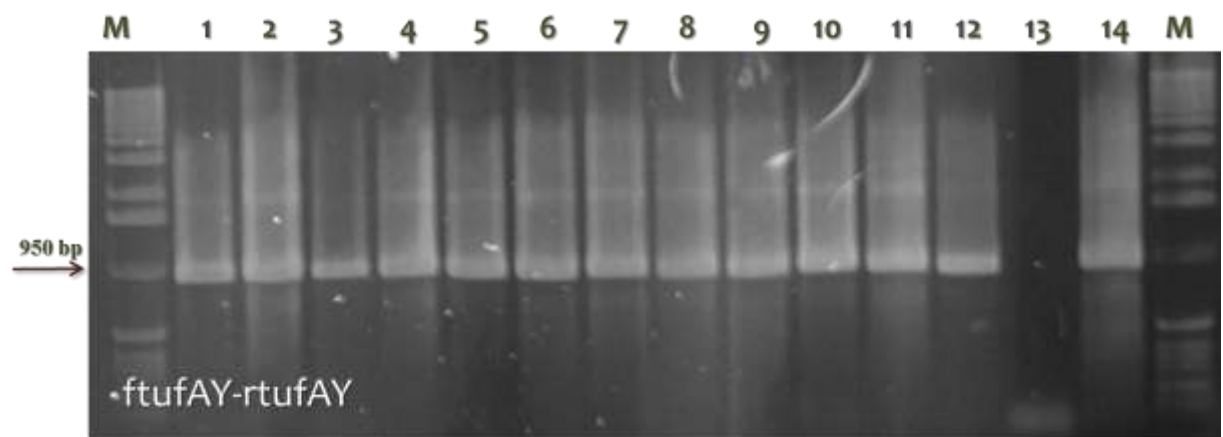


Слика 4. Избор на специфична група на прајмери за детекција на *Bois noir* фитоплазма (столбур)

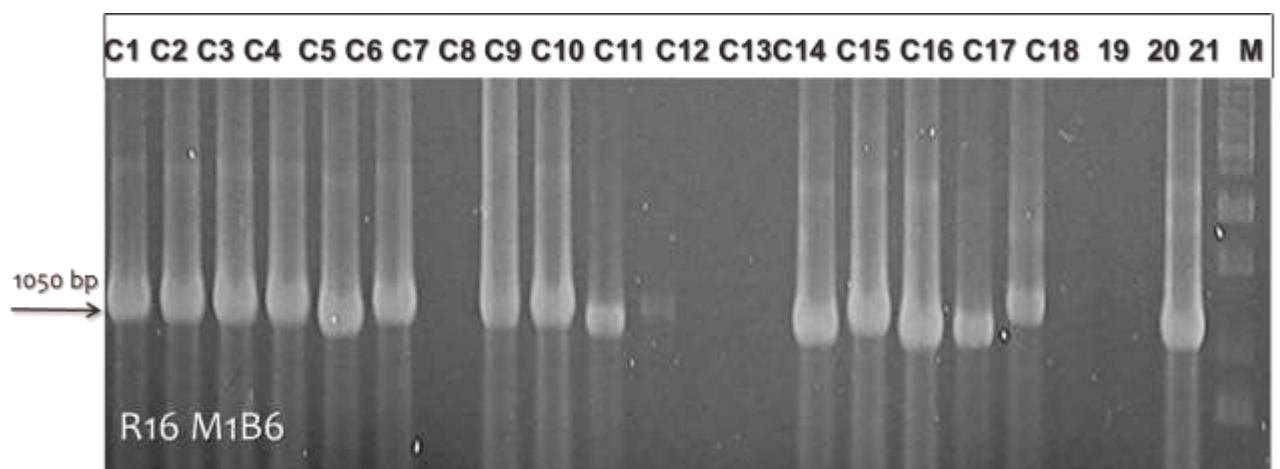




**Слика 5.** Гел електрофореза (агароза 1%) на nested PCR амплификациски примероци на фитоплазми 16 SrDNA од винова лоза (Таб. 1) со M1B6 прајмер пар

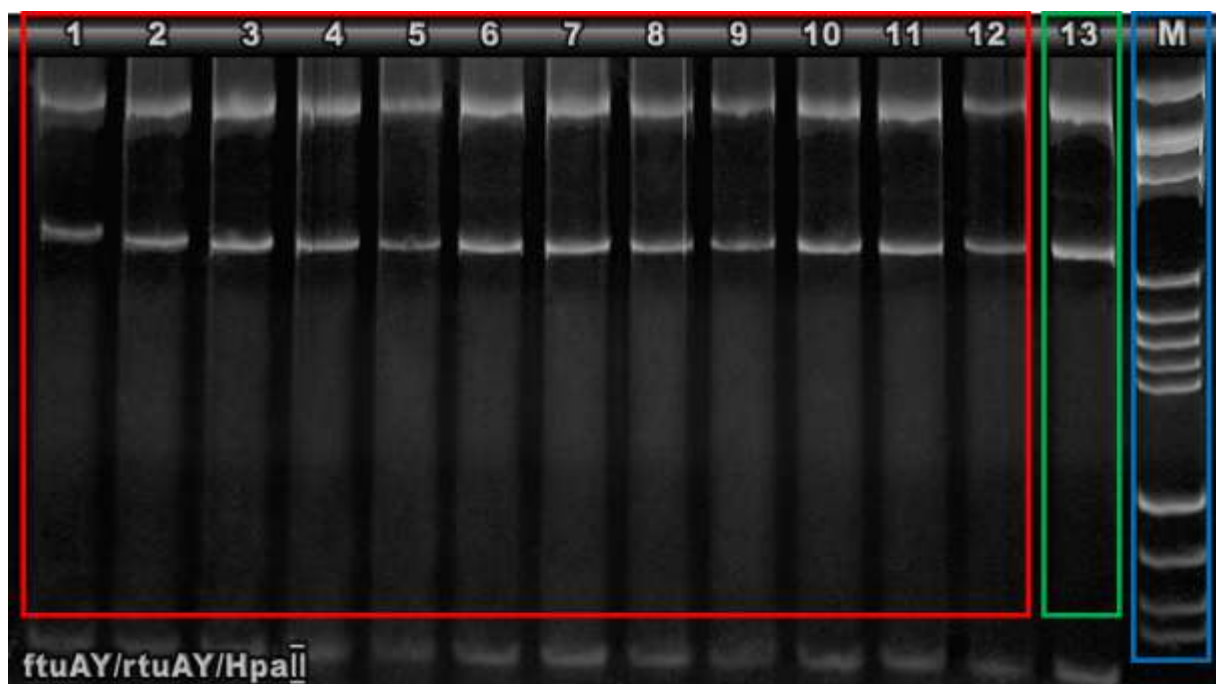


**Слика 6.** Гел електрофореза (агароза 1%) на nested PCR амплификациски примероци на фитоплазми 16 SrDNA од винова лоза (Таб. 1) со специфична група на прајмери (ftufAY-rtufAY)

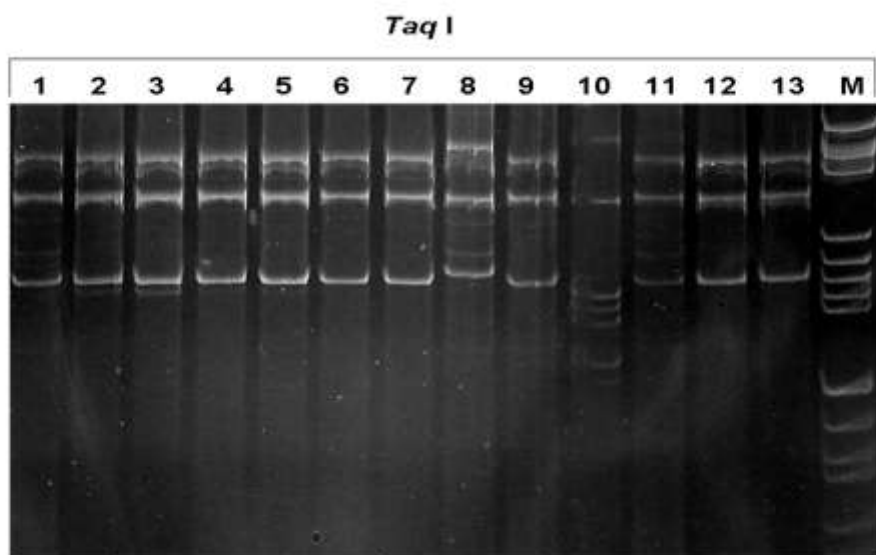




**Слика 7.** Гел електрофореза (агароза 1%) на nested PCR амплификациски примероци на фитоплазми 16 SrDNA од винова лоза (Таб. 1) со специфична група на прајмери (R16 M1B6)

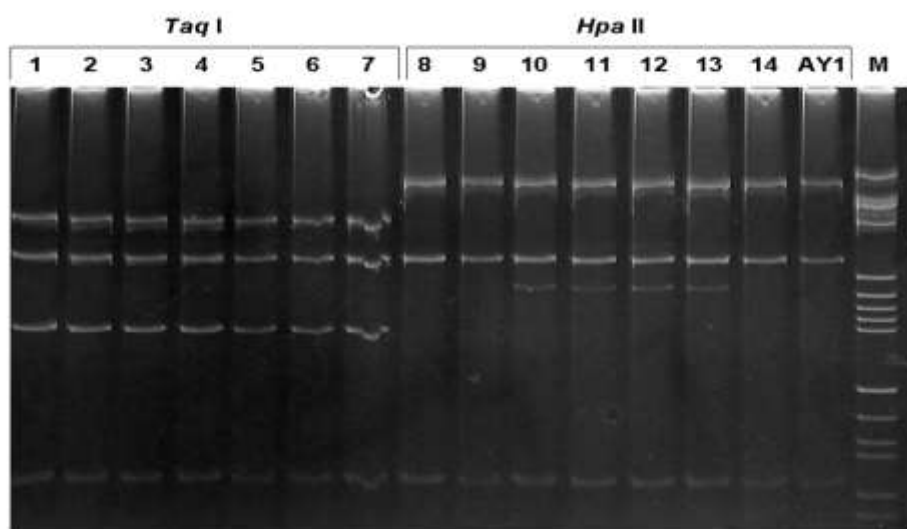


**Слика 8.** RFLP анализа - полиакриламиден гел (13%). Амплифицираната ДНК е дигестирана со ензимот *Hpa* II користен е pBR322 е ДНА молекуларен маркер со големина на фрагментите: 587, 540, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 123 и 104 bp



**Слика 9.** RFLP анализа - полиакриламиден гел (13%). Амплифицираната ДНК е дигестирана со ензимот *Taq* I користен е pBR322 е ДНА молекуларен маркер со големина на фрагментите: 587, 540, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 123

и 104 bp



**Слика 10.** RFLP анализа - полиакриламиден гел (13%). Споредба на амплифицираните геноми со *Taq* I и *Hpa* II рестрикциските ензими

● Republic of Macedonia



[www.ugd.edu.mk](http://www.ugd.edu.mk)  
<http://dpep.ugd.edu.mk/>